

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051302078

UDC _____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

芍药苷的单克隆抗体制备及其中药材的免疫法测定

Preparation and immunoassay of monoclonal antibodies against
bioactive Paeoniflorin of Chinese materia medica

邵 幼 岩

指导教师姓名: 徐 金 森 副教授

专 业 名 称: 细 胞 生 物 学

论文提交日期: 2008 年 6 月

论文答辩时间: 2008 年 7 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 李祺福 教授

评 阅 人: _____

2008 年 07 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（中药复方芍药甘草汤活性成分的单克隆抗体制备及剔除分析法的建立）课题（组）的研究成果，获得（该）课题（组）经费或实验室的资助，在（徐金森）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要.....	1
Abstract	3
第一章 前 言.....	5
1 芍药的研究现状.....	5
1.1 芍药的分类与分布.....	5
1.2 白芍与赤芍.....	7
1.3 芍药的化学成分.....	8
2 我国中药研究的现状与挑战	9
2.1 药用植物的开发利用.....	9
2.2 复方中药的研究进展与存在问题.....	10
2.3 中药的质量控制.....	12
3 单克隆抗体(MAbs)在中药研究中的应用	13
3.1 单克隆抗体的应用优势.....	13
3.2 单克隆抗体制备的基本原理和流程.....	15
4 ELISA 技术在中药研究中的应用	17
4.1 ELISA 的基本原理	18
4.2 ELISA 的关键试剂与类型	18
5 研究的目的和意义	18
第二章 材料与方 法.....	22
1 材料.....	22
1.1 主要仪器.....	22
1.2 主要试剂与材料.....	23
1.3 常用溶液和培养液的配制.....	24
2 方法.....	27
2.1 人工抗原的合成与鉴定.....	27
2.2 人工抗原 PF-HSA 的动物免疫.....	28
2.3 抗 Paeoniflorin(PF)单克隆抗体生产流程.....	30

2.4 抗 PF 单克隆抗体的特征鉴定	37
2.5 ELISA / HPLC 法测定赤芍的 PF 含量	39
第三章 结果与分析	41
1 PF-载体蛋白偶联效果鉴定	41
1.1 MALDI-TOF MS 测定 PF-HSA 和 PF-OVA 半抗原数测定	41
1.2 PF-HSA 偶联物的紫外吸收光谱鉴定	43
1.3 PF-HSA 人工抗原的合成产率	44
2 Balb/c 小鼠免疫效果	44
2.1 免疫过程中的血清效价监测	44
2.2 融合前小鼠血清效价	45
2.3 小鼠血清特异性分析	46
3 杂交瘤细胞株的建立	46
3.1 SP2/0 骨髓瘤细胞的准备	46
3.2 细胞融合率及抗体阳性率	47
3.3 阳性杂交瘤细胞的筛选、克隆化及建株	47
3.4 抗 PF 单克隆抗体的大量生产与鉴定	50
4 抗 PF 单克隆抗体的性质鉴定	522
4.1 Ig 类型判断	522
4.2 抗 PF MAbs 的效价检测	522
4.3 抗 PF MAbs 的灵敏度与亲和常数测定	53
4.4 抗 PF 单克隆抗体的特异性分析	55
5 竞争 ELISA 和 HPLC 检测结果比较	59
5.1 间接竞争 ELISA 法测定 PF 含量	59
5.2 HPLC 法测定赤芍中 PF 含量	59
结 论	62
参考文献	64
致 谢	70
附 录	71

Contents

Abstract(in Chinese)	1
Abstract(in English).....	3
Chapter 1. Preface	5
1 Actuality of Paeoniae Radix study.....	5
1.1 Classing and distribution of <i>Paeonia L.</i>	5
1.2 Radix paeoniae alba and radix paeoniae rubra	7
1.3 Chemical compounds of Paeoniae Radix	8
2 Current challenges in studies of herbal mendicines in China.....	9
2.1 The exploiture of medicinal plants	9
2.2 The state and problems of prescriptions of traditional Chinese medicine(TCM) study.....	10
2.3 Quality control in the TCM products.....	12
3 The applications of MAbs in the TCM study	13
3.1 The advantages of MAbs using in TCM researches	13
3.2 The principle and protocol of preparation of MAbs	15
4 The applications of ELISA in the TCM researches.....	17
4.1 The principle of ELISA	18
4.2 The key reagents and types of ELISA	18
5 The aim and potentiality of this work	18
Chapter 2. Materials and methods.....	22
1 Materials	22
1.1 Apparatus	22
1.2 Reagents and other chemicals	23
1.3 The preparation of solutions	24
2 Methods.....	27
2.1 The synthesis and determination of the artificial antigens.....	27
2.2 Immunization with PF-HSA.....	28
2.3 The preparation of anti-PF MAbs	30
2.4 Characteristics determination of the anti-PF MAbs.....	37
2.5 Quantification of paeoniflorin by ELISA and HPLC	39
Chapter 3. Results and analysis.....	41

1 Determination of PF-carrier conjugates	41
1.1 Determination of hapten number of PF-HSA by MALDI-TOF MS	41
1.2 Hapten number determination of PF-HSA by UV scan spectra	43
1.3 The synthesis rate of PF-HSA.....	44
2 Immune effects of the Balb/c mice.....	44
2.1 Antibody titres in mouse after immunization	44
2.2 The detection of titres of antiserum before fusion of cells	45
2.3 Specificity of the antiserum	466
3 Establishment of hyridomas producing anti-PF MAbs.....	46
3.1 P reparation of SP2/0	46
3.2 The fusion rate	47
3.3 Selection and EIISA screening of hybridomas	47
3.4 Large-scale produce and determination of the MAbs.....	50
4 Characteristics of the anti-PF MAbs.....	522
4.1 The type of Ig Estimation	522
4.2 Titres Determination of the MAbs.....	522
4.3 Assay sensitivity and affinity of the MAbs.....	53
4.4 Assay specificity of the MAbs	55
5 Comparing the results of competitive ELISA and HPLC	59
5.1 Quantification of PF by competitive ELISA	59
5.2 Quantification of PF by HPLC	59
Conclusions	62
References	64
Acknowledgement	70
Appendix	71

缩 略 语

缩写	英文全称	中文名称
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt	2,2-吡嗪双(3-乙基-6-苯并噻唑啉磺酸)二铵盐
ACN	acetonitrile	乙腈
Alb	albiflorin	芍药内酯苷
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
eRDF	enrich-RPMI 1640-Dulbecco's-Ham's F12 medium	改良型RPMI 1640培养基
FBS	fetal bazine serum	胎牛血清
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine	次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷
HPLC	high-performance liquid chromatography	高效液相色谱
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
HSA	albumin human serum	人血清白蛋白
HT	hypoxanthine-thymidine	次黄嘌呤-胸腺嘧啶核苷
IgG	immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kDa	kilo daltons	千道尔顿
MAbs	monoclonal antibodies	单克隆抗体
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry	基质辅助激光解析电离飞行时间质谱
PAbs	polyclonal antibodies	多克隆抗体
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PF	paeoniflorin	芍药苷
SA	sinapic acid	芥子酸

S-PBS	PBS containing 5% skim milk	含5%奶粉的PBS
TCM	traditional Chinese medicine	中药
TFA	trifluoroacetic acid	三氟乙酸
TPBS	PBS containing 0.05% Tween 20	0.05%吐温20 PBS
UV	ultra violet	紫外

厦门大学博硕士论文摘要库

摘 要

分子生物学等生物技术的快速发展,为中药的研究开辟了许多新的途径。其中,应用小分子量中药活性成分的单克隆抗体(monoclonal antibodies,MAbs)建立的免疫测定系统已成为受体结合分析、酶测定等研究的一个重要工具,也是药用植物的一种定性定量分析技术,这些都与MAbs的特异亲和力、可大量生产等相关。但是,单克隆抗体用于现代中医药的研发方面的文献至今尚所见不多,因此,亟需探索有关单抗技术在中医药研究中的技术基础及其应用。

本研究的目的是通过制备芍药的主要活性成分—芍药苷(paeoniflorin,PF)的单克隆抗体,从而建立以此为基础的酶联免疫测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法,对生药和方剂中的芍药苷进行定量分析。内容主要包括人工抗原的合成与鉴定、动物免疫及细胞融合、抗体筛选与纯化、MAbs性质测定、利用制成的单抗建立ELISA方法及其验证等。

首先采用高碘酸钠法将PF分别与人血清白蛋白(albumin human serum, HSA)或鸡卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)结合形成偶联物PF-HSA、PF-OVA。通过MALDI-TOF MS和紫外光谱对偶联物进行鉴定,PF-HSA半抗原数 >9 ,人工抗原合成成功。再用聚乙二醇法(PEG 1450)将PF-HSA免疫的Balb/c小鼠脾细胞与对次黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶核苷(HAT)敏感的小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0融合形成杂交瘤细胞,细胞的融合得率较高,可达87.19%。通过HAT培养基筛选、ELISA检测杂交瘤细胞的培养上清液和多次有限稀释克隆化,最终获得两株能稳定分泌抗PF单克隆抗体的杂交瘤细胞,分别命名为P1E6和P5H10。

其次,分别用体外无血清培养和腹水诱生两种方法大量生产单克隆抗体。所得单抗经蛋白质G亲和柱纯化,SDS-PAGE和MALDI-TOF MS检测,MAbs纯度很高,Protein G亲和柱法纯化抗体成功。通过ELISA法对抗体的特性进行测定,腹水抗体效价可达 $1:256000$;两种MAbs的灵敏度分别为 $0.080\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.124\text{ }\mu\text{g/ml}$;P1E6亲和常数是 $1.819\times 10^{-7}\text{ mol/L}$,P5H10为 $2.815\times 10^{-7}\text{ mol/L}$;所得两种MAbs具有高度特异性,和PF有强烈的交叉反应,同芍药内酯苷的交叉反应率较低,分别为0.322%、0.524%;与樟脑的交叉反应率为0.018%和0.078%。其他几种结构类似物几乎不与MAbs P1E6和P5H10发生交叉反应。两株MAbs均可用于PF的含量测定和筛选分析。

最后, 将抗 PF 的 MAbs 应用于 ELISA 分析, 建立了直接定量测定样品 (赤芍) PF 含量的免疫测定方法。结果显示样品的竞争性 ELISA 检测结果与 HPLC 的检测结果基本一致, 且竞争 ELISA 比 HPLC 法的灵敏度高很多。

和 HPLC 相比, 新的 ELISA 分析法更为快速、灵敏、操作简便且重现性良好。它的建立使得大量样品的快速测定成为可能, 特别适于有效成分含量极少的样品, 可用来定量测定芍药及其复方中药的芍药苷总含量。总之, 新建立的竞争 ELISA 方法可能成为测定不同样品中 PF 含量的强有力工具, 从而对其进行生产质量控制和药理标准化研究。

关键词: 芍药苷; 单克隆抗体; 酶联免疫测定

Abstract

Immunoassay systems using monoclonal antibodies (MAbs) against naturally occurring bioactive compounds having lower molecular weights have become one of important tools for the studies on receptor binding analysis, enzyme assay, and qualitative and/or quantitative analysis techniques in herbal medicines owing to their specific affinity. However, there are not many reports and references about the applications of MAbs in the traditional Chinese medicine (TCM) researches. Therefore, it is necessarily urgent to introduce the immunoassay techniques in the studies of TCM exploitation and applications.

This work aimed at the preparation of the anti-PF MAbs and the establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the concentration of paeoniflorin (PF), which is a major bioactive constituent in *Paeoniae Radix*. This immunochemical approach can be used to determine the PF in crude drug and/or prescription samples.

This work mainly includes the procedures:

Synthesis of antigen conjugates and determination of hapten number in PF-carrier protein conjugates,

Immunization and hybridization,

Screening and purification of MAbs,

Characterization of the MAbs against PF,

Establishment of an ELISA for PF by using anti-PF MAbs and its validation.

PF-carrier protein conjugates (PF-HSA / PF-OVA) were artificially synthesized by the method using NaIO_4 , and the hapten number of the conjugates of PF-HSA was determined to be nine by MALDI-TOF-MS and UV scanning technology. This hapten number was estimated to be enough for the successive animal immunization. Splenocytes yielded from PF-HSA-immunized Balb/c mice were fused with hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT)-sensitive mouse myeloma cell SP2/0 by PEG 1450. The fusion rate was 87.19 %. Following fusion, the cells were selected by HAT medium. Then hybridomas were cloned by the limiting dilution method and screened by indirect ELISA. Two hybridomas producing MAbs reactive to PF were obtained. They were named P1E6 and P5H10.

Large-scale antibody production was performed by the culture of established hybridomas in serum-free eRDF medium and by the generation of ascites in mice.

Each MAb was purified using a Protein G column. The purity of the obtained MAbs was estimated by the SDS-PAGE and the MALDI-TOF MS to be high enough for the ELISA test. The characteristics of the MAbs were also tested by ELISA. The titre of ascites containing MAbs was 1:256000. The sensitivity were 0.0797 µg/ml and 0.124 µg/ml respectively. The affinity constant of MAbs P1E6 And P5H10 were 1.819×10^{-7} and 2.815×10^{-7} mol/L, respectively. They have very high reactivity with PF. while MAbs P1E6 and MAbs P5H10 cross-reacted with albiflorin weakly, 0.322%, 0.524%. The cross-reactivities of MAbs P1E6 and P5H10 against camphor were 0.018 % and 0.078%. The other structural analogs nearly did not cross-react. This showed the high specific activity of PF MAbs against PF. Base on the above-mentioned characteristics of purified anti-PF MAbs to determine the concentration of the extraction.

A series of *Paeoniae Radix* samples have been determined by the competitive ELISA using anti-PF MAbs, and the results showed good agreement with that determined by traditional high-performance liquid chromatography (HPLC), whereas the established competitive ELISA was much sensitive than the HPLC.

Some obvious advantages of the newly established ELISA are its rapidity, sensitivity, simplicity and good reproducibility in comparison with HPLC. It's will also useful especially when large number of small and impure samples are to be analyzed. Not only the ELISA can be used to determine the total concentration of PF in *Paeoniae Radix* and/or compound prescription of TCM study, quality control and standardization of pharmacological activity of a crude drug and its prescription.

Key words: paeoniflorin; monoclonal antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

第一章 前言

芍药 (*Paeoniae Radix*) 是毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根(图 1-1), 是一种常用中药^[1,2]。《诗经》最早使用“芍药”之名, 而芍药在医学中的应用, 首载于我国现存最早的医学方书《五十二病方》。中国现存最早的一部药物学专著《神农本草经》则较系统地记载了芍药的性味功效主治及生境等内容, 奠定了后世芍药临床应用的基础。该典籍将芍药列为中品, 即兼具治病作用并能滋补虚弱。有关芍药记载如下: “芍药, 味苦, 平, 有小毒。治邪气腹痛, 除血痹, 破坚积, 寒热, 疝瘕, 止痛, 利小便, 益气。生川谷及丘陵。”在此之后, 张仲景《伤寒论》和《金匱要略》中对于芍药的应用极为广泛, 在众多药物中应用频次居前。梁朝陶弘景在《本草经集注》首次提出了赤、白芍药之不同^[3]。由于芍药具有平肝止痛, 养血调经, 敛阴止汗之功效, 现今芍药常与许多其他中草药配伍, 更加灵活广泛地用于治疗胸腹腰肋疼痛, 自汗盗汗, 阴虚发热, 月经不调, 崩漏带下, 是妇科常用中药之一^[4]。



图1-1 芍药^[2]

Fig.1-1 Chinese peony

1 芍药的研究现状

1.1 芍药的分类与分布

毛茛科植物世界上仅一属(芍药属 *Paeonia lactiflora*), 约35种, 分布于北

温带, 大部分产亚洲。多数种类的根、根皮供药用, 有镇痉、止痛、凉血散瘀之效。芍药属根据其生长习性和花盘形状分为两组: 一是牡丹组, 我国产三种(不包括变种), 即牡丹、黄牡丹和紫牡丹。二是芍药组, 约30种, 系多年生草本, 主要分布在欧、亚大陆温带地区。另有两种产美洲, 有的把它们另列为一组, 称美洲芍药组。国外产的芍药组植物, 都是花卉的重要种, 其中最主要的有四种: 蕨叶芍药, 原产保加利亚和高加索; 淡黄芍药、黄芍药, 原产黑海和里海之间地区; 红心芍药, 原产欧洲南部。中国是最早实现芍药园艺栽培的国家, 芍药作为观赏栽培距今已有3900多年的栽培历史, 驰名中外, 其根入药, 目前我国山东菏泽、河南洛阳等地已逐渐发展栽培、研究中心, 并成了规模化商品性生产基地。最早对芍药进行分类研究是俄国学者 P.S.Pallas, 1776年首次发表了芍药的一个种 *Paeonia lactiflora* Pall., 与我国的芍药是同一个种。我国对于芍药科(属)的分类进行了多次修订, 2001年洪德元认为在中国芍药属共有15种, 4亚种, 其中芍药组有7种, 2亚种。7种包括: 草芍药(*P. obovata* Maxim.)、美丽芍药(*P. mairei* Levl.)、芍药(*P. lactiflora* Pall.)、多花芍药(*P. emodi* Wall. ex Roy)、白花芍药(*P. sterniana* Fletcher)、新疆芍药(*P. anomala* L.)和块根芍药(*P. intermedia* C. A. Mey)。拟草芍药(*P. obovata* subsp. *willmottiae* (Stapf) D. Y. Hong & K. Y. Pan)和川赤芍(*P. anomala* var. *veitchii* (Lynch) D. Y. Hong & K. Y. Pan)分别是草芍药和新疆芍药的亚种^[5]。草芍药别名山芍药、野芍药, 主要分布在我国安徽、贵州北部、河北、黑龙江、河南东南部、湖南西北部、江西北部、吉林东部、辽宁、内蒙古东南部、四川南部、浙江西北部, 药材主产于吉林、黑龙江, 在朝鲜、日本及苏联远东地区也有分布; 拟草芍药分布于甘肃东南部、河南西部、湖北西部、宁夏南部、青海东部、陕西南部、山西及四川东部北部, 药材主产四川; 美丽芍药主要分布于甘肃东南部、贵州西北部、湖北西南部、陕西南部、四川中南部及云南东北部, 药材主产四川; 芍药多分布于东北、华北、陕西及甘肃南部, 其栽培品根作白芍药用, 药材主要栽培于安徽、浙江、四川等省, 按产地不同, 分别称“亳白芍”、“杭白芍”和“川白芍”; 其野生品根做赤芍药用, 主产于内蒙古、黑龙江、吉林和辽宁, 其中内蒙古多伦县附近是赤芍的传统道地产区, 芍药在朝鲜、日本、蒙古和苏联西伯利亚地区也有分布; 多花芍药分布西藏南部, 在尼泊尔、印度北部也有分布; 白花芍药产于西藏东南部; 新疆芍药产新疆北部; 川赤芍主要分布于西藏东部、四川西部、青海东部、甘肃及陕西西南部, 根作赤

芍药用，药材因加工方法不同，又有刮皮赤芍与原皮赤芍之分，药材主产四川；块根芍药分布于新疆北部^[6]。上述的芍药组的几个种（亚种）的根均有在当地或更广范围内作赤芍药用，仅有芍药种的栽培品根做为白芍使用。

1.2 白芍与赤芍

芍药分为白芍和赤芍（图1-2），两者都是现代临床应用极为广泛的中药材。据《中国药典》2005 版（一部）白芍为芍药科多年生草本植物芍药 *Peaonia lactiflora* Pall.的根，赤芍为芍药科多年生草本植物芍药 *P.lactiflora* Pall.或川赤芍 *P. veitchii* Lynch的根^[1]。除此之外，芍药还有多种变种用于临床。早期的中医文献不分白芍、赤芍，统称为芍药。尤其在唐以前的文献中，芍药的名称应用较多，而赤芍、白芍的名称却极为鲜见。直至梁朝陶弘景才最早提出了赤、白芍药的不同。



白芍与饮片



赤芍与饮片

图1-2 赤芍、白芍及其饮片

Fig.1-2 *Paeonia Lactiflora* Pall. and herbal roots

两者的区分主要在于产区或加工方法不同，一般认为，芍药野生品的根直接洗净晾干即成赤芍，而栽培品的根去皮水煮后即白芍。赤芍味苦，性微寒，可清热凉血、散瘀止痛，用于瘟毒发斑，血热吐衄，目赤肿痛，肝郁胁痛，血滞经闭，症瘕腹痛，跌打损伤，痈肿疮疡^[7]。白芍则能滋阴平肝、养血调经、止痛、止汗，有解痉、抗炎、抗溃疡、保肝、解毒、抗肿瘤、抑菌和对免疫功能双向调节等作

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库